青杨脊虎天牛 *CYP4G2* 基因片段的克隆、序列分析与表达

关桦楠，迟德富*，宇 佳，李晓灿
（东北林业大学生命科学学院，哈尔滨 150040）

摘要：根据报道的十几种昆虫 CYP4 家族基因的氨基酸序列保守区域设计一对引物，利用 RT-PCR 技术扩增编码青杨脊虎天牛 *Xylotechus rusticus* 中肠细胞色素氧化酶 CYP4G2 蛋白的 cDNA 片段，构建原核表达载体 pET-CYP4G2，将其转化入大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 中表达。序列分析结果表明，该基因（*CYP4G2*，GenBank 登录号为 EF429250）保守区域阅读框全长 387 bp，编码 129 个氨基酸残基，预测分子量和等电点分别为 16.9 kD 和 5.75；推导的氨基酸序列与已报道的昆虫 CYP4 家族氨基酸序列一致性较高（63% ~ 86%），且具有细胞色素氧化酶的典型特征。IPTG 诱导后，SDS-PAGE 电泳检测到一条 22 kD 大小的外源蛋白，与预测融合蛋白的分子量大小相应。CO 差光谱分析证明重组菌表达了有活性的 pET-CYP4G2。

关键词：青杨脊虎天牛；细胞色素 P450 酶系；*CYP4G2* 基因；克隆；表达
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2008)04-0357-08

Cloning，sequencing，and expression of cDNA fragments of *CYP4G2* from *Xylotechus rusticus* L.（Coleoptera：Cerambycidae）in *Escherichia coli*

GUAN Hua-Nan，CHI De-Fu*，YU Jia，LI Xiao-Can（Department of Life and Sciences，Northeast Forestry University，Harbin 150040，China）

Abstract：A pair of primers was designed based on the reported sequences of conservative amino acid regions of CYP4 protein family in insects. The cDNA encoding the cytochrome CYP4G2 protein was isolated from the intestines of *Xylotechus rusticus* L. by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The cDNA fragment was constructed to prokaryotic expression vector that named pET-CYP4G2 for overexpression in *Escherichia coli* JM109. Sequence analysis showed that the full-length of *CYP4G2* (GenBank accession no. EF429250) open reading frame (ORF) was 387 bp，encoding 129 amino acid residues；the predicted MW and pI were 16.9 kD and 5.75，respectively. The deduced amino acid sequence showed high identity to the reported sequences of CYP4 family amino acids from other insects (63% ~ 86%) and shared the typical structural features of cytochrome from other insects. After induction with IPTG，its molecular weight was found to be about 22 kD by checking with SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight was the same as the prediction of fusion protein. Carbon monoxide (CO) difference spectrum analysis confirmed that the recombinant strain expressed pET-CYP4G2 with biological activity.

Key words：*Xylotechus rusticus*；cytochrome P450；*CYP4G2*；cloning；expression

细胞色素 P450 单加氧化酶系（cytochrome P450-dependent monooxygenases）是一类广泛分布于生物体内的重要氧化酶系，其主要组分是细胞色素 P450（cytochrome P450，CYP）。CYP 的还原态与 CO 结合后在波长 450 nm 处具有特征光吸收峰，它是整个酶系中的末端氧化酶，在许多内源和外源化合物的氧化、过氧化和还原代谢中起着重要作用（Nelson *et al*.，1993）。昆虫 CYP 的作用涉及到昆虫的生长、发育、取食等过程，主导昆虫对杀虫剂的抗药性的形成和对植物有毒物质耐受性的提高，并在植食性昆虫

基金项目：国家自然科学基金项目(30671694)；黑龙江省科技攻关项目(GB06B304)；黑龙江省杰出青年基金项目(2005 年)

作者简介：关桦楠，男，1983 年 4 月，硕士，主要研究方向为昆虫分子生物学，Tel.：13796034276；E-mail：guanhuanan3@163.com
通讯作者 Author for correspondence，E-mail：chidefu@126.com

收稿日期 Received：2007-07-15；接受日期 Accepted：2008-04-15

与植物的协同进化进程中扮演重要角色。CYP是一种含血红素分子和硫羟基的结合蛋白，所有的CYP都具有血红素保守结构的共有序列FxxGxxxCxG和N端膜锚定疏水序列(Scott，1999)。CYP超基因家族中最大的组群为CYP4和CYP6家族。通常认为CYP6家族成员与昆虫抗药性关系密切，但是近期研究表明CYP4家族的一些成员也与昆虫抗性有关(Ranson *et al*.，2002)。

青杨脊虎天牛 *Xylotechus rusticus* L.为鞘翅目(Coleoptera)天牛科(Carambrcidie)天牛亚科(Cerambycinae)脊虎天牛属 *Xylotrechus*。此害虫寄主范围较广，是危害杨属 *Populus*、柳属 *Salix* 等多种阔叶树的毁灭性蛀干害虫(严善春等，2006)，在黑龙江省中西部以杨树为主的防护林区危害十分严重(王志英等，2006)。长期以来，随着杀虫剂的广泛使用，昆虫对杀虫剂的抗药性也日益提高，昆虫抗药性的研究将为害虫防治提供新的思路和途径。本实验根据昆虫抗性基因 *CYP*4 的氨基酸序列保守区域设计一对引物，采用RT-PCR法扩增青杨脊虎天牛CYP4家族基因，构建原核表达载体，为青杨脊虎天牛细胞色素P450酶系的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

青杨脊虎天牛敏感品系、大肠杆菌JM109菌种以及表达载体pET28a+由东北林业大学昆虫分子生物学实验室提供。克隆载体pMD18-T、DNA分子量标准、蛋白质分子量标准、限制性内切酶、T4 DNA连接酶和Taq聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司。凝胶纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自华舜生物工程有限公司。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 青杨脊虎天牛中肠总RNA的提取

取羽化一周的青杨脊虎天牛的中肠0.5 g冷冻研成粉末，加入500 μL经65℃预热的缓冲液(2% CTAB、2% PVP、25 mmol/L EDTA、2.0 mol/L NaCl和100 mmol/L Tris-HCl)，振荡30 s，65℃水浴5 min；用氯仿/异戊醇抽提两次，1/4体积的LiCl(10 mol/L) 4℃沉淀10 min；4℃离心10 min(12 000 g)；无水乙醇清洗沉淀2次；蒸干无水乙醇，低温去离子水溶解沉淀。

1.3 引物的设计

检索GenBank已报道的昆虫CYP4基因的氨基酸序列，并进行序列一致性比对，根据保守区域设计引物。为了便于将目的基因克隆到表达载体pET-28a+上，在正反引物中分别设计了 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ酶切位点(以下划线表示)。引物序列如下：上游引物P1为5′-CGGAATTCGGAGCAGTTACTTCTGTCATG-3′；下游引物P2为5′-TAGGATCCTGAAACTGCATTCGGACAGAA-3′。

1.4 目的片段的扩增

以合成的cDNA第1链为模板，反应体系为20 μL，内含10×Buffer 2 μL，正反引物各1 μmol/L，dNTPs 0.25 mmol/L，Taq聚合酶1.5 U，模板1 μg。体系扩增条件：94℃预变性4 min，94℃变性1 min，53℃复性1 min，72℃延伸1 min，30个循环，最后72℃延伸7 min。目的片段的获得在PTC-200扩增仪上进行。

1.5 PCR产物的克隆和鉴定

将回收纯化的PCR产物与pMD18-T载体连接，然后转化大肠杆菌JM109，蓝白斑筛选，随机挑取一白色菌落，培养后提取质粒。用 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切和目的片段PCR扩增这两种方法来鉴定阳性克隆pMD18-CYP4G2。

1.6 序列的测定和分析

DNA的序列测定在上海生物工程技术服务有限公司进行。利用生物信息学方法对测序结果进行分析：序列相似性搜索使用BLAST工具(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)；核酸序列的基本物理性状及同源性比对使用DNAMAN软件；蛋白质序列的基本物理性状分析预测软件用ProtParam(http://au.expasy.org/tools/)；疏水性计算软件(http://www.expasy.org/cgi-bin/Protscale.pl)；NCBI的GenBank序列提交软件使用SEQUIN(4.50)；蛋白结构观察DEEPVIEW(http://www.expasy.org/spdbv/)。蛋白质3D结构预测软件Swiss-Model(http://swissmodel.expasy.org/repository)。

1.7 表达载体的构建、鉴定及序列测定

使用 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ将目的片段从克隆载体上切下，与经过同样双酶切的原核表达载体pET-28a+相连接，转化入大肠杆菌JM109中。过夜培养后提取质粒DNA，用 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ双酶切鉴定阳性克隆，获得表达载体pET-CYP4G2，并描绘载体构建过程。挑取经初步鉴定了的阳性克隆送由上海生物工程技术服务有限公司进行测序，将拼接的测序结果与1.6获得的序列比对鉴定，验证原核表达载体中插入片段的读码框的完整性。

1.8　诱导表达与检测

提取经鉴定了的质粒 pET/CYP4G2，转化入大肠杆菌 JM109 中培养；活化接种后，培养菌液；当菌液的 $OD_{600} = 0.5$ 时，加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，37℃、200 rpm 条件下分别诱导 2，3，4 和 6 h，观察各组菌液的表达差异（每种条件设置 3 个重复）；对结果进行 SDS-PAGE 检测（刘仪等，2002）。利用紫外分光光度计（UV2600），采用 CO 示差分光光谱法检测菌液中血红蛋白的活性（于慧敏等，2002）。

2　结果与分析

2.1　基因的克隆及鉴定

对青杨脊虎天牛中肠 cDNA 为模板扩增的 DNA 产物，进行琼脂糖凝胶电泳分析，结果见图 1。由图 1 可知，扩增产物长度约 400 ~ 500 bp，与已报道的其他昆虫 CYP4 家族基因片段的大小基本一致（李秀兰等，2006）。根据国际 P450 命名委员会的要求（Nelson *et al*.，1996），将该基因命名为青杨脊虎天牛 *CYP4G2*。将纯化后的扩增片段与 pMD18-T 载体连接，转化入大肠杆菌 JM109 的感受态细胞中；筛选、挑取阳性克隆，提取质粒，用 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切法和 PCR 扩增法鉴定，从而获得带有 *CYP4G2* 基因的重组质粒 pMD18/CYP4G2（图 2）。由图 2 可以看出，酶切鉴定中出现的 2 条 DNA 带和扩增检测中的产物条带大小均与预期值大小一致。

2.2　序列的测定和分析

序列拼接所得的核苷酸及其推导出的氨基酸序列如图 3 所示。N-端膜锚定疏水序列和血红素结合位点用双下划线标示。

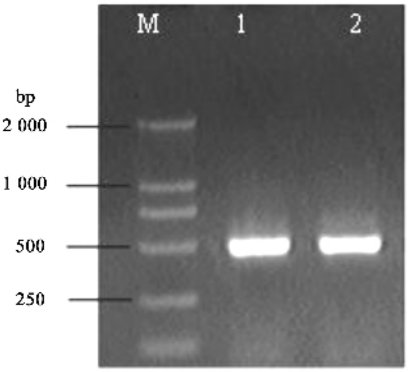

图 1　CYP4G2 基因的扩增

Fig. 1 PCR amplification of *CYP4G2*

M：DL2000；1，2：PCR 产物 PCR products.

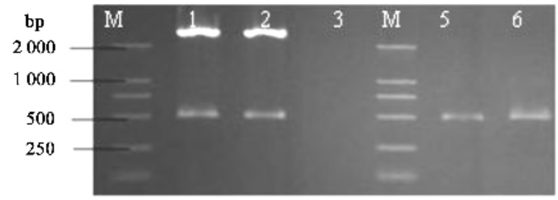

图 2　阳性克隆的鉴定

Fig.2　Identification of positive clones

M：DL2000；1，2：重组子 pMD18/CYP4G2 的 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切 pMD18/CYP4G2 digested with *Eco*R Ⅰ and *Bam*H Ⅰ；3：PCR 的阴性对照 PCR without template；5，6：重组子 pMD18/CYP4G2 的 PCR 扩增 PCR amplification of pMD18/CYP4G2.

序列测定和结果分析表明，该基因序列阅读框架（ORF）全长 387 bp，编码 129 个氨基酸，分子量 16 951.2 D，推测 pI = 5.75。该蛋白具有细胞色素 P450 单加氧化酶的氨基酸序列保守结构，序列中含有一个血红素结合位点 FTAGPRNCIGT 和一个 N-端膜锚定疏水序列（图 3）。在 N-端膜锚定疏水序列中，20 个氨基酸里含有 12 个疏水氨基酸，此外该序列的其他区域也含有较为丰富的疏水结构域（图 4）。

```
1      CGGCTGGCCGGGGAGCAGTTTCTTCTGTCATGATGGGTCTTCACCAGGACGTCCAAGCCA
1                                                W  V  F  T  R  T  S  K  P
                                                   N-terminal membrane anchoring signal
61     CAGGTTGTGCAAGAGCTGTACGAAATCTTCGGAGATTCCGACAGGCCGGCAACCTTTGCC
21      Q  V  V  Q  E  L  Y  E  I  F  G  D  S  D  R  P  A  T  F  A
121    GACACCTTGGAGATGAAGTACTTGGAGAGGTGCCTCATGGAGACCTTGAGGTTGTACCCA
41      D  T  L  E  M  K  Y  L  E  R  C  L  M  E  T  L  R  L  Y  P
181    CCAGTGCCAGTCATCGCCAGGAAGTTGAACCAGGAAGTGAAATTGGCATCTGGAGACTAC
61      P  V  P  V  I  A  R  K  L  N  Q  E  V  K  L  A  S  G  D  Y
241    ATCCTGCCCGCTGGAGCCACCATCGTCATCGGTACCTTCAAGGTGCACCGTACCGAGGAG
81      I  L  P  A  G  A  T  I  V  I  G  T  F  K  V  H  R  T  E  E
301    ATCTACCCCAACTGCGACAAATTCGACCCTGACAACTTCCTTCCAGAACGTTCTGCCAAC
101     I  Y  P  N  C  D  K  F  D  P  D  N  F  L  P  E  R  S  A  N
361    AGGCACTACTATGCCTTCATTCCCTTCACGGCTGGACCCCGAAACTGCATTGGAACATGA
121     R  H  Y  Y  A  F  I  P  F  T  A  G  P  R  N  C  I  G  T  *
                                       Heme-binding region
```

图 3　*CYP4G2* 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3　Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of *CYP4G2*

推定的 N 端锚定疏水序列和血红素结合位点分别用双下划线标示。

Deduced N-terminal membrane anchoring signal and heme-binding region are doubly underlined.

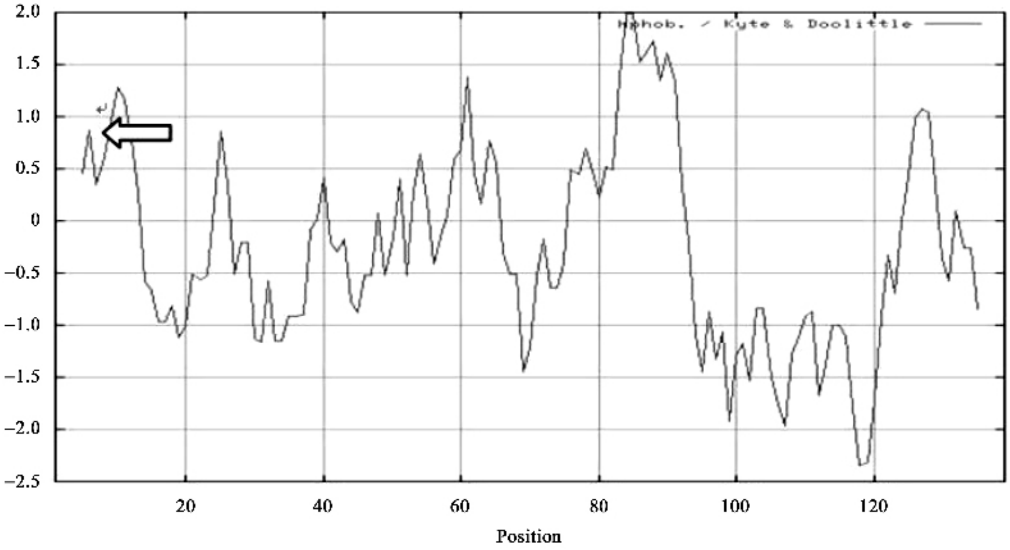

图 4 *CYP4G2* 的推导的氨基酸序列疏水性轮廓

Fig. 4 Hydrophobicity profile of the deduced amino acid sequence of *CYP4G2*

使用 NCBI 的 BLAST 进行同源序列检索，得到同源序列达 90 多个，挑选其中 6 种序列一致性较高的昆虫 CYP4 家族基因的序列（表 1）与推导的青杨脊虎天牛 CYP4 氨基酸序列进行一致性区域比对，并建立同源比较图（图 5）。由图 5 和表 1 可知，推导的青杨脊虎天牛 CYP4 基因的氨基酸序列与其他 6 种昆虫的 CYP4 家族基因的氨基酸序列都具有典型保守结构——血红素结合位点，且保守区域同源性很高（63% ~ 86%）；其中推导序列与家蚕 *Bombyx mori* CYP4G2 氨基酸序列相似性达到 86.1%，与冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* CYP4G9 和日本天蚕 *Antheraea yamamai* CYP4G2 的遗传相似度也分别达到了 82.8% 和 84.8%。利用 SEQUIN（版本号 4.50）软件将 CYP4G2 基因序列提交到 NCBI 的 GenBank 数据库，序列登录号为 EF429250。

从图 6（SWISS-MODEL 处理号：AAAa0J4Pr）可直观地了解到 CYP4G2 序列的蛋白 3D 模拟结构及分布在表面的丰富的网状静电区域。

2.3 原核表达载体的构建及重组子的鉴定

pMD18/CYP4G2 和 pET-28a + 均以 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切，纯化后，在 T4 DNA 连接酶的作用下连接，构建重组质粒 pET-CYP4G2（图 7）。pET-

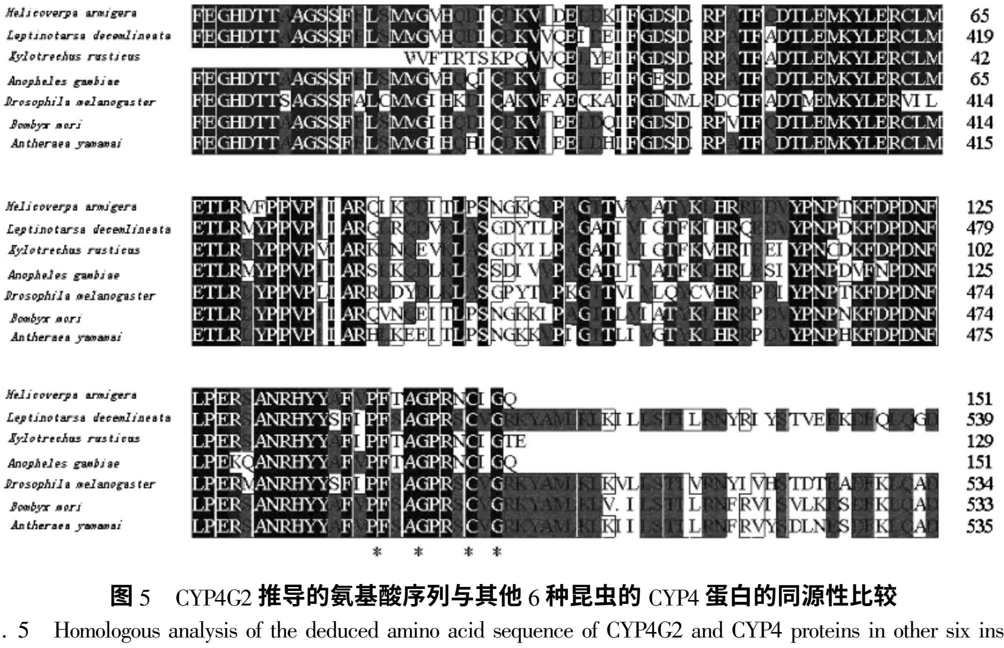

图 5 CYP4G2 推导的氨基酸序列与其他 6 种昆虫的 CYP4 蛋白的同源性比较

Fig. 5 Homologous analysis of the deduced amino acid sequence of CYP4G2 and CYP4 proteins in other six insects

昆虫名称见表 1 The names of insects as shown in Table 1；"＊"：血红素结合位点 FxxGxxxCxG Heme-binding region FxxGxxxCxG.

CYP4G2 经双酶切检测后，得到大于 5 000 bp 的 pET-28a + 线性片段和 500 bp 左右的插入片段（图 8），成功的构建出青杨脊虎天牛 *CYP4G2* 的原核表达质粒。

表 1　青杨脊虎天牛 *CYP4G2* 基因片段与其他昆虫氨基酸序列比对

Table 1　Alignment of *CYP4G2* from *Xylotechus rusticus* with the CYP genes from some other insects

昆虫名称 Insects	基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank accession no.	一致性（%） Homology
日本天蚕 *Antheraea yamamai*	*CYP4G2*	BAD81026	84.8
冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*	*CYP4G9*	AAL58550	82.8
棉铃虫 *Helicoverpa armigera*	*CYP4B3*	HAU86002	63
家蚕 *Bombyx mori*	*CYP4G2*	DQ443326	86.1
果蝇 *Drosophila melanogaster*	*CYP4V1*	NM-080292	66.2
马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*	*CYP4D3*	AAZ94273	78.8

2.4　序列测定

测序结果与 GenBank 发表序列（EF429250）的比较可以看出，重组载体的插入片段与 EF429250 序列的相似性高达 99%，序列编码完整，读框准确。

2.5　诱导表达的 SDS-PAGE 和 CO 差光谱分析

经 IPTG 诱导的 pET-CYP4G2 于大肠杆菌 JM109 中各时间的表达情况如图 9 所示。由图 9 可知，经 IPTG 诱导的菌液可产生 22 kD 左右的特异蛋白带，其表达量随诱导时间的延长而增加。诱导时间 2 h 时，特异蛋白表达量微弱；诱导时间 3 h 时，特异蛋白的表达量增强；诱导时间分别达到 4 h 和 6 h 时特异蛋白的表达量基本一致，说明已接近峰值；含空质粒和未经 IPTG 诱导的菌液中未见特异蛋白的表达。

CO 差光谱法测定 CYP 的还原态的血红蛋白活性，结果表明：重组子 pET-CYP4G2 与对照菌相比在 450 nm 左右有明显的吸收峰（图 10），说明该重组菌表达的 pET-CYP4G2 有生理活性。

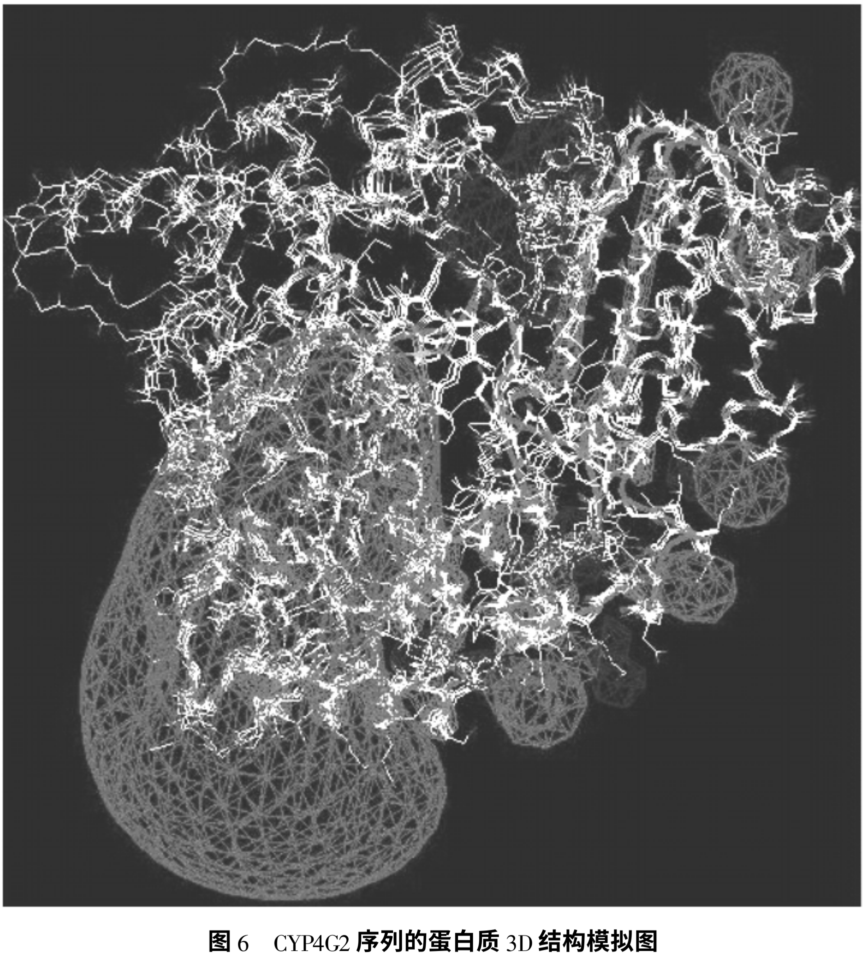

图 6　CYP4G2 序列的蛋白质 3D 结构模拟图

Fig. 6　Simulation 3D structure of the CYP4G2 protein

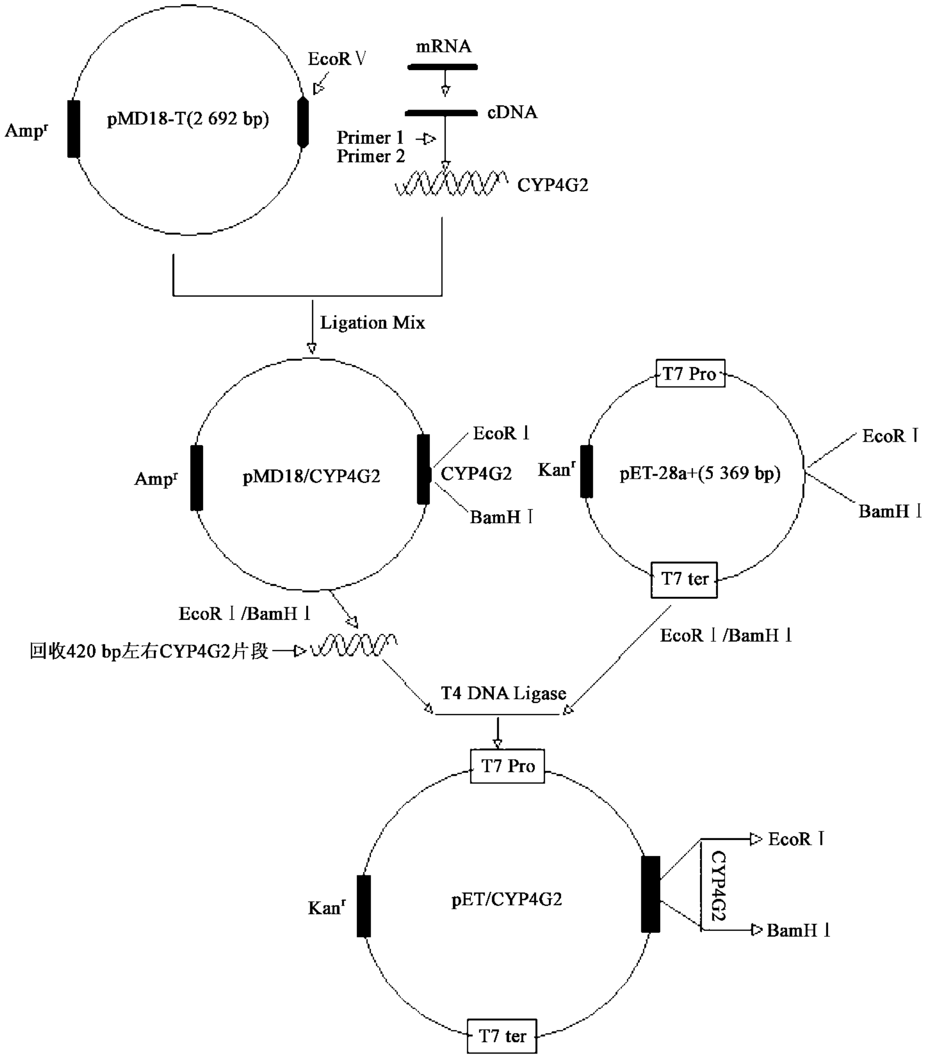

图 7 重组表达载体 pET-CYP4G2 **构建图**

Fig. 7 Construction of recombinant expression vector pET-CYP4G2

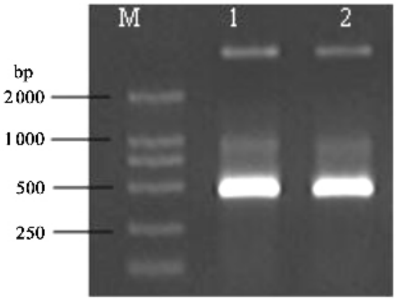

图 8 重组表达载体 pET-CYP4G2 **的鉴定**

Fig. 8 Identification of recombinant expression vector pET-CYP4G2

DL2000；1，2：**重组子** pET-CYP4G2 **的** *Eco*R Ⅰ **和** *Bam*H Ⅰ **双酶切** pET-CYP4G2 digested with *Eco*R Ⅰ and *Bam*H Ⅰ.

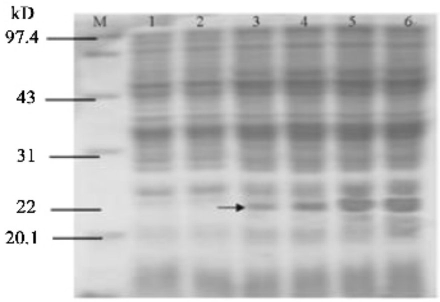

图 9 重组表达载体 pET-CYP4G2 **在大肠杆菌中的表达**

Fig. 9 Expression of recombinant expression vector pET-CYP4G2 in *E. coli*

M：**蛋白分子量标准** Protein Marker；1：**含空质粒的大肠杆菌** JM109（*E. coli* JM109 transformed with pET28a +）；2：**未经诱导的含** pET-CYP4G2 **的大肠杆菌** JM109（*E. coli* JM109 transformed with pET-CYP4G2 without IPTG induction）；3 – 6：**含有** pET-CYP4G2 **的大肠杆菌** JM109 **分别经** IPTG **诱导** 2，3，4 **和** 6 h（*E. coli* JM109 transformed with pET-CYP4G2 after induction with IPTG for 2，3，4 and 6 h，respectively）.

3 讨论

化学农药的使用导致昆虫抗药性的产生；目

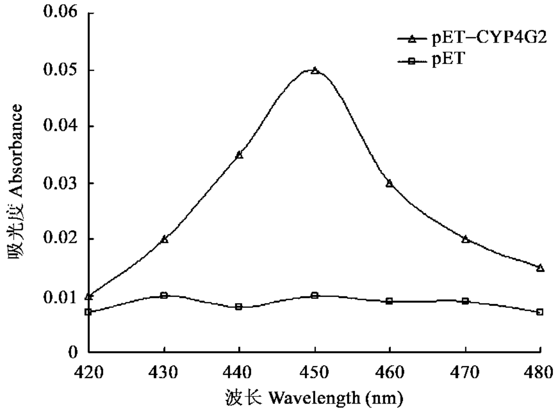

图 10　重组菌表达产物 pET-CYP4G2 的 CO 差光谱
Fig. 10　CO difference spectrum analysis of the expressed pET-CYP4G2

前，昆虫抗药性已经成为农林业治理和媒介昆虫防治的主要障碍；因此，昆虫抗药性的研究为害虫防治提供了新的思路与途径。昆虫 P450 酶系介导昆虫抗药性相关代谢的反应。细胞色素 P450 是单加氧化酶系的末端氧化酶，在各种杀虫剂如拟除虫菊酯、有机氯化合物及氨基甲酸酯类化合物等的代谢中起重要作用（王东等，2006）。细胞色素 P450 酶系 CYP4 家族的一些成员与昆虫抗性有关如 CYP4D、CYP4H 和 CYP4G 等（朱昌亮等，2001）。近年来，人们已经从 30 余种昆虫中获得 200 余个 CYP4 家族的基因或变异体（Danielson *et al*.，1998），其作用的机制可能是基因转录增强、氨基酸残基改变和 P450 过量表达等（Snyder *et al*.，1995）。

研究天牛 P450 基因的结构、功能是了解其参与天牛生长、发育和诱导抗药性机制的一个极其重要的环节。迄今为止，未见有关天牛的细胞色素 P450 基因序列获得及其抗性研究的报道。本文首次以青杨脊虎天牛为实验材料，利用 RT-PCR 技术克隆出 *CYP4G2* 基因片段，并构建出克隆载体 pMD18-CYP4G2 和原核表达载体 pET-CYP4G2。实验中得到的片段开放读码框全长 387 bp，编码 129 个氨基酸残基，其 3′末端不含有加尾信号（AATAAA），5′端未见 Kozak 序列，因此克隆得到的片段并不是全长基因（李秀兰等，2006）。但是该片段中含有 P450 基因家族的保守结构，能够反映出全长基因氨基酸的真实性，也为以后的实验奠定了基础。

生物信息学分析结果表明，诱导出的特异蛋白半衰期较短（3 h），原因可能是非全长基因的不完整而造成的空间构象不稳定（朱昌亮等，2001）。CYP4G2 序列的蛋白质 3D 模型的结构分析中显示，其表面特殊区域分布着静电势，静电势是维系蛋白质二聚体稳定的重要因素，主导着蛋白之间的相互作用（Nelson *et al*.，1995）。结构图所展示的蛋白的空间构象和静电势的分布为此蛋白功能的应用提供了理论基础和科学依据。

利用生物信息学方法，分析目标基因的一些主要特性，这些特性的获得有效加深了对该基因的理解，但 CYP4 家族基因理论特性的验证有待进一步试验。鉴定青杨脊虎天牛 *CYP4G2* 基因是否介导其本身抗药性相关代谢反应，还需克隆出该片段的全长基因，构建真核表达体系及体外重组酶系来研究外源化学物质的代谢状况，并最终确定其功能。目前，本实验室正在利用 RACE 技术克隆该序列的全长基因。

参考文献（References）

Danielson PB，Foster JL，McMahill MM，Smith MK，Fogleman JC，1998. Induction by alkaloids and phenobarbital of family 4 cytochrome P450s in *Drosophila*：evidence for involvement in host plant utilization. *Molecular and General Genetics*，259（1）：54－59.

Li XL，Teng D，Ma L，Zhu CL，2006. Cloning and bioinformatics analyzing of CYP4E2r6 gene of *Culex pipiens pallens*. *Journal of Pathogen Biology*，1（2）：110－112.［李秀兰，腾达，马磊，朱昌亮，2006. 淡色库蚊抗溴氰菊酯品系 CYP4E2r6 基因的克隆与生物信息学分析. 中国病原生物学杂志，1（2）：110－112］

Liu Y，Yu JL，Zhang L，Li DW，Zhang ZC，1999. Expression and purification of movement protein and its two mutants of cucumber mosaic virus. *Acta Phytopathologica Sinica*，29（2）：132－137.［刘仪，于嘉林，张力，李大伟，张振臣，1999. 黄瓜花叶病毒运动蛋白基因及其缺失突变体在大肠杆菌中的表达和表达产物的纯化. 植物病理学报，29（2）：132－137］

Nelson DR，Kamataki T，Waxman DJ，Guengerich FP，Estabrook RW，Feyereisen R，Gonzalez FJ，Coon MJ，Gunsalus IC，Gotoh O，1993. The P450 superfamily：update on new sequence，gene mapping，accession numbers，early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA and Cell Biology*，12（1）：1－51.

Nelson DR，Koymans L，Kamataki T，Stegeman JJ，Feyereisen R，Waxman DJ，Waterman MR，Gotoh O，Coon MJ，Estabrook RW，Gunsalus IC，Nebert DW，1996. P450 superfamily：update on new sequence，gene mapping，accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*，6（1）：1－42.

Ranson H，Nikou D，Hutchinson M，2002. Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector，*Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*，11（5）：409－418.

Scott JG，1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，29（9）：757－777.

Snyder MJ，Stevens JL，Andersen JF，Feyereisen R，1995. Expression of cytochrome P450 genes of CYP4 family in midgut and fat body of the tobacco hornworm，*Manduca sexta*. *Archives of Biochemistry and*

Biophysics, 321(1): 13 - 20.

Wang D, Xu YX, Wei ZG, Zhao HQ, Chen YH, Li B, Shen WD, 2006. Cloning and sequence analysis of CYP6B29 gene, a member of cytochrome P450 family from silkworm. *Science of Sericulture*, 32(3): 328 - 332. [**王东,许雅香,卫正国,赵华强,陈玉华,李兵,沈卫德**,2006. **家蚕细胞色素** P450 **家族** CYP6B29 **的克隆与序列分析**. **蚕业科学**,32 (3): 328 - 332]

Wang ZY, Liu KY, Zhang GC, Hu CX, Hu XH, 2006. Control technique for *Xylotechus rusticus* L. *Journal of Northeast Forestry University*, 34 (5): 1 - 3. [**王志英,刘宽余,张国财,胡春祥,胡显慧**,2006. **青杨脊虎天牛防治技术**. **东北林业大学学报**,34 (5) : 1 - 3]

Yan SC, Chen H, Yang H, Yuan HE, Zhang J, Chi DF, 2006. Effects of plant volatiles on the EAG response and behavior of the grey tiger longicorn, *Xylotrechus rusticus* (L.) (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta Entomologica Sinica*, 49(5)): 759 - 767. [**严善春,程红,杨慧,袁红娥,张健,迟德富**,2006. **青杨脊虎天牛对植物源挥发物的** EAG **和行为反应**. **昆虫学报**,49(5)): 759 - 767]

Yu HM, Shi Y, Shen ZY, Yang SL, 2002. Carbon monoxide difference spectrum analysis of *Vitreoscilla* hemoglobin in recombinant *E. coli*. *Journal of Tsinghua University* (*Science and Technology*), 42 (5): 615 - 618. [**于慧敏,史悦,沈忠耀,杨胜利**, 2002. CO **差光谱法分析重组大肠杆菌中的透明颤菌血红蛋白**. **清华大学学报(自然科学版)**, 42 (5): 615 - 618]

Zhu CL, LI JM, Gao XH, Tian HS, Li XL, Shen B, Wu GL, 2001. Studies on cytochrome P450 genes in the mosquito. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 28(1): 61 - 66. [**朱昌亮,李建民,高晓红,田海生,李秀兰,沈波,吴观陵**,2001. **淡色库蚊细胞色素** P450 **基因研究**. **生物化学与生物物理进展**,28 (1): 61 - 66]

(责任编辑:黄玲巧)